

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Turková

SWI2/SNF2 ATPázy se zaměřením na podrodinu ISWI:
proteinové komplexy a myší modely pro jejich studium

SWI2/SNF2 ATPases with a focus on the ISWI subfamily:
protein complexes and mouse models for their study

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

Doc. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

Praha, 2014

Chtěla bych zejména poděkovat Mgr. Tomáši Zikmundovi za veškerou jeho pomoc, cenné rady a podporu při psaní této práce a svému školiteli Doc. MUDr. Tomáši Stopkovi, Ph. D. za cenné rady a trpělivost.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16.05.2014

Podpis:

Abstrakt

DNA je v buněčném jádře sbalena spolu s proteiny do dynamické struktury zvané chromatin. Během buněčného cyklu podléhá struktura chromatinu výrazným změnám. V interfázi jsou některé jeho části rozvolněny a během buněčného dělení se pak dostává do podoby velmi kondenzovaných mitotických chromozomů. Struktura chromatinu má vliv na genovou expresi. Pro její průběh je nutná vazba proteinů na DNA. Aby byl umožněn přístup DNA vazebným faktorům, chromatin musí být v rozvolněné podobě. Pokud by však byla struktura kondenzovaná, byla by pro DNA vazebné proteiny prakticky nepřístupná. Remodelace struktury chromatinu je tedy jedním z nástrojů ovlivňujících genovou expresi a enzymy, které remodelaci zajišťují, jsou pro buňku velmi důležité. Jedním z nich je ATPáza Smarca5 patřící do proteinové podrodiny ISWI, která tvoří katalytickou podjednotku několika odlišných komplexů remodelujících chromatin v závislosti na ATP. Bylo zjištěno, že mutace ve členech těchto komplexů mají vliv na regulaci transkripce a diferenciaci buněk. V některých případech může nesprávná funkce těchto komplexů vést k nádorové transformaci. Tato bakalářská práce je zaměřena na popis funkce jednotlivých komplexů remodelujících chromatin, jejichž podjednotkou je ATPáza Smarca5. Dále jsou zde shrnuty současné myší modely užívané pro výzkum funkce těchto komplexů. Myší modely přinášejí lepší pochopení vlivu změny exprese komplexů remodelujících chromatin na procesy probíhající v buňkách. Mohou také pomoci objasnit mechanismus nádorové transformace, ke které s určitou pravděpodobností může dojít po narušení míry správné funkce enzymů hrajících roli při remodelaci chromatinu, jako je protein Smarca5.

Klíčová slova

Remodelace chromatinu, ISWI, komplexy remodelující chromatin-závislé na ATP, Smarca5, myší modely

Abstract

In the nucleus the DNA is packed along with proteins into a dynamic structure called chromatin. During cell cycle the chromatin structure becomes a subject to various changes. During interphase chromatin structure becomes loose while shortly before cell division it undertakes the form of highly condensed mitotic chromosomes. Structure of chromatin influences significantly mode of gene expression and its pattern. DNA-binding proteins interacting within chromatin are also necessary during this process. To gain the access to the DNA binding factors, the chromatin has to be in a loosened form. As long as the structure of the chromatin is more condensed it creates a barrier for the DNA binding proteins. Therefore it becomes obvious that the remodeling of the chromatin structure is one of the important regulators of gene expression and that the enzymes, which execute remodeling, are of great importance. One of them is ATPase Smarca5, which belongs to the protein subfamily ISWI and which creates the catalytic subunit for several different ATP-dependent chromatin remodeling complexes. Mutations of members of those complexes disturb regulation of transcription and cellular differentiation. In some cases the incorrect function of these complexes can lead to cellular transformation into a tumours state. This bachelor thesis aims to describe structure and function of ISWI chromatin remodeling complexes with the focus on ATPase Smarca5. Furthermore, it reviews the mouse models useful for studying function of these complexes. The mouse models can accelerate better understanding of how expression changes of chromatin remodeling complexes affect biological processes within the cells and facilitate understanding of mechanisms of the cellular transformation.

Keywords

Chromatin remodeling, ISWI, ATP-dependent chromatin-remodeling complexes, Smarca5, mouse models

Obsah

1	Seznam zkratek	1
2	Úvod.....	3
3	Struktura chromatinu a jeho remodelace	4
4	Komplexy remodelující chromatin v závislosti na ATP.....	9
4.1	Komplex ACF.....	11
4.2	Komplex CHRAC.....	13
4.3	Komplex RSF	14
4.4	Komplex NoRC	15
4.5	Komplex WICH.....	16
5	Myší modely	18
5.1	Modely pro protein Smarca1	19
5.2	Modely pro protein Smarca5	20
5.3	Modely pro proteinové komplexy s katalytickou podjednotkou Smarca5	22
6	Závěr	25
7	Seznam použité literatury.....	27

1 Seznam zkratk

ACF	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a Acf1 (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor)
AML	Akutní myeloidní leukémie
ATP	Adenosin trifosfát
CHD	Název jedné z podrodin patřících do proteinové rodiny SWI2/SNF, jinak také označovaná Mi-2 (Chromodomain and helicase-like domain)
CHRAC	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5, Acf1, CHRAC-15 a CHRAC-17 (Chromatin accessibility complex)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
INO80	Název jedné z podrodin patřících do proteinové rodiny SWI2/SNF2 (Inositol requiring 80)
ISWI	Název jedné z podrodin patřících do proteinové rodiny SWI2/SNF2 (Imitation mating type switch)
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NoRC	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a Tip5 (Nucleolar remodeling complex)
PHD	Vazebná doména proteinů umožňující interakci s methylovanými lysiny histonů (Plant homeodomain)
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
RSF	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a Rsf-1 (Remodeling and spacing factor)
Smarca1	Faktor remodelující chromatin závislý na ATP, který tvoří katalytickou podjednotku ISWI komplexů, jinak také nazývaný Snf2l (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1)
Smarca5	Faktor remodelující chromatin závislý na ATP, který tvoří katalytickou podjednotku ISWI komplexů, jinak také nazývaný Snf2h (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5)

Snf2h	viz Smarca5 (Sucrose nonfermenting 2 homolog)
Snf2l	viz Smarca1 (Sucrose nonfermenting 2 like)
SWI/SNF	Proteinová rodina na ATP závislých faktorů remodelujících chromatin (Mating type switch/Sucrose nonfermenting)
Tip5	Protein vyskytující se spolu se Smarca5 v komplexu NoRC (Transcription termination factor 1 (Ttf1) – interacting protein 5)
WICH	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a WSTF (WSTF–ISWI chromatin remodeling complex)
WSTF	Protein vyskytující se spolu se Smarca5 v komplexu WICH, gen pro tento transkripční faktor je jedním z deletovaných genů u Williamsova syndromu (Williams syndrome transcription factor)

2 Úvod

V eukaryotických buňkách je DNA složena do struktury chromatinu, jehož funkcí je udržet DNA v co nejkompaktnější podobě, ale zároveň přístupnou pro DNA vazebné faktory. Základní jednotkou této struktury je nukleozóm tvořený oktamerem histonových proteinů, který obtáčí vlákno DNA. Nukleozómy hrají roli nejenom při kondenzaci DNA, ale také při regulaci genové exprese. Rozmístění nukleozómů na vlákne a modifikace jednotlivých histonů mají vliv na strukturu chromatinu a přístupnost DNA pro proteiny. Existují dvě skupiny proteinů, které mají schopnost modifikovat strukturu chromatinu. První skupina vytváří kovalentní modifikace na histonech, jako je například acetylace nebo methylace příslušných aminokyselinových zbytků. Druhou skupinou jsou na ATP závislé faktory remodelující chromatin, které využívají energii vzniklou hydrolýzou ATP k destabilizaci interakcí mezi histony a DNA, k odstraňování nebo modifikaci stávajících nukleozómů, k vytváření nových nebo k posunu nukleozómů po vlákne. Tyto faktory se často vyskytují ve větších komplexech spolu s dalšími proteiny. Jejich činnost může mít vliv na aktivaci nebo represi genové exprese. Mutace v genech pro podjednotky komplexů remodelujících chromatin závislých na ATP mohou vést k deregulaci transkripce a diferenciaci buněk, což může mít za následek nádorovou transformaci. Pro studium vedoucí k lepšímu porozumění těchto problémů se využívají myší modely se změněnou expresí proteinů, které hrají roli při remodelaci chromatinu. Naše laboratoř se zabývá studiem proteinu Smarca5, které je jedním z faktorů remodelujících chromatin závislých na ATP. Ve své práci bych nejprve ráda popsala funkce jednotlivých komplexů, jejichž katalytickou podjednotkou je protein Smarca5, a nastínila tak, jakých všech procesů v buňce se může tento protein účastnit. Dále bych ráda popsala současné myší modely, které jsou zaměřené přímo na protein Smarca5 nebo na některou z dalších podjednotek komplexů, které tento protein vytváří.

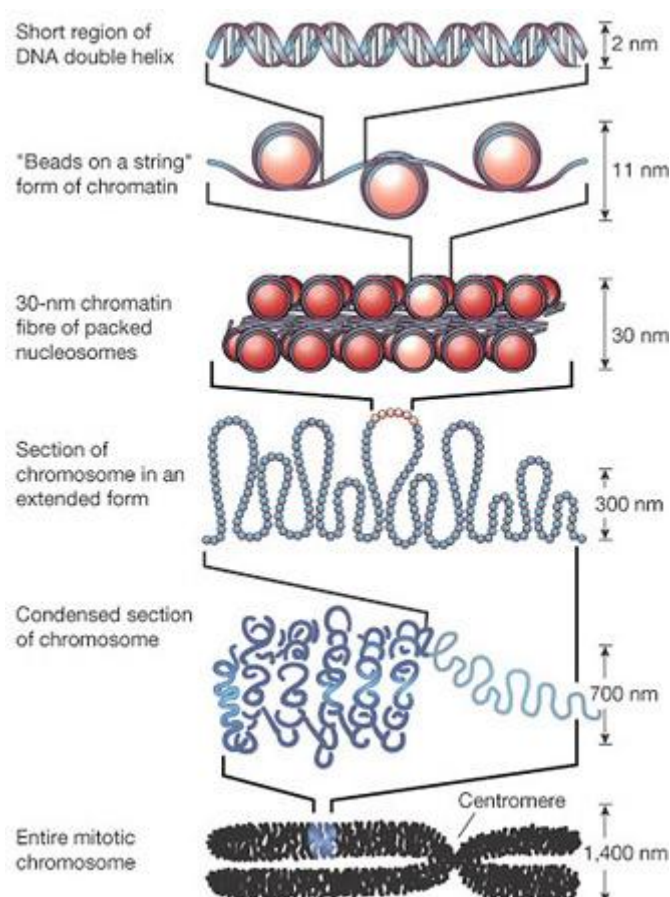
V následujících kapitolách popíši strukturu chromatinu a možnosti jeho remodelace, kterými jsou kovalentní modifikace histonů a změny katalyzované komplexy remodelujícími chromatin závislými na ATP. Dále se zaměřím na protein Smarca5 a popíšu funkce jednotlivých komplexů, ve kterých tento protein tvoří katalytickou podjednotku. V další kapitole popíši myší modely pro studium funkce proteinu Smarca5 a komplexů, ve kterých se nachází, a naznačím jejich význam pro studium tohoto proteinu.

3 Struktura chromatinu a jeho remodelace

Jaderná DNA eukaryotních buněk se nachází v komplexu s proteiny a společně s nimi vytváří strukturu zvanou chromatin. V chromatinu je vlákno DNA vázáno na molekuly, které umožňují jeho kondenzaci do vysoce organizovaných struktur. Až několik metrů dlouhé vlákna DNA se musí uspořádat do buněčného jádra o průměru pouze několika mikrometrů. Takto uspořádaná DNA však musí být zároveň přístupná vazebným proteinům a enzymatickým aparátům, jež umožňují přepis a replikaci genetické informace, popřípadě opravy jejího poškození. Pro buňku je proto nutné, aby byla celá struktura velmi dobře organizována. K tomuto účelu se vyvinula řada specializovaných molekul, které zajišťují organizaci chromatinu, tedy především znovuvytvoření, kondenzaci a rozvolňování.

Existuje několik stupňů kondenzace DNA. Prvním a nejzákladnějším z těchto stupňů je nukleozóm. Ten se skládá z jádra nukleozómu tvořeného oktamerem, tedy čtyřmi páry, bazických proteinů, tzv. histonů - H2A, H2B, H3 a H4. Na jimi tvořené jádro je navinuta molekula DNA o délce 147 párů bází. Dva sousedící nukleozómy jsou od sebe odděleny tzv. „linkerem“ tedy úsekem DNA, který se vyskytuje v obnažené podobě nebo ve vazbě s dalším histonem – histonem H1. Linkerový úsek DNA je dlouhý 10 až 90 nukleotidů (Richmond and Davey 2003). V této podobě, označované také jako 11 nm vlákno, je DNA přístupná pro DNA vazebné proteiny a mohou se na ní realizovat důležité procesy, např. přepis genetické informace, opravy nebo její zdvojení. Struktura 11 nm vlákna připomíná „korálky na provázku“ (anglicky „beads on a string“), když si jako korálky představíme nukleozómy a jako provázek šroubovici DNA. Dalším uspořádáním jednotlivých histonových oktamerů a vytvořením více či méně pravidelných rozestupů mezi nimi, umožní buňka vzniku dalšímu stupni kondenzace, tedy vláknu o průměru 30 nm tvořenému šroubovicí z nukleozómů. Ve šroubovici jsou k sobě nukleozómy výrazně přiblíženy díky vazbě proteinů na linkerové vlákno DNA, které pomáhají celou strukturu stabilizovat. V jádře existuje chromatin ve dvou podobách. Ty se nazývají euchromatin a heterochromatin. Tyto dvě formy byly rozlišeny na základě jejich barvitelnosti, euchromatin se barví méně intenzivně než heterochromatin, což naznačuje, že struktura heterochromatinu je více kondenzovaná. Vlákna o průměru 11 nm a 30 nm tvoří v buněčném jádru rozvolněnou strukturu, pravděpodobně odpovídající euchromatinu. Vytvářením sekundárních struktur a smyček 30 nm vlákna vzniká vysoce kondenzovaná struktura heterochromatinu. K tvorbě heterochromatinu pomáhá celá řada dalších proteinů včetně tzv. scaffold proteinů (anglicky scaffold = lešení). Bylo zjištěno, že v 30 nm chromatinovém vlákne jsou vzdálenosti mezi jednotlivými jádry nukleozómů různě

dlouhé a obecně delší, než jsou ve vysoce kondenzované struktuře heterochromatinu, kde jsou oktamery histonů na vláknech rozmístěny v kratších a velmi pravidelných rozestupech (Wu, Bassett et al. 2007). Kondenzace chromatinu má tedy řadu úrovní od vlákna s nukleozómy až po vysoce kondenzovanou strukturu heterochromatinu. Celá struktura podléhá periodickým změnám, a proto jsou enzymy zajišťující tyto procesy velmi důležité.



(zdroj: http://www.integratedhealthcare.eu/1/en/histones_and_chromatin/1497/)

Obr. 1: Přehled jednotlivých stupňů kondenzace DNA od dvoušroubovice, přes 11 nm vlákno, 30 nm vlákno a další struktury, tvořené různými smyčkami, až k mitotickému chromozomu.

Chromatinová struktura je velmi dynamická a podíl heterochromatinu a euchromatinu v ní se může měnit. Zatímco při buněčném dělení je DNA složena do podoby vysoce kondenzovaných mitotických chromozomů, které se rozchází do dceřiných buněk, během interfáze je nutné určitou část této struktury rozvolnit a zpřístupnit DNA vazebným proteinům, jež jsou pro vývoj a život buňky esenciální. Remodelace chromatinu je pro buňku velmi důležitá i z toho důvodu, že je jedním z klíčových mechanismů regulace genové exprese. Během buněčné diferenciaci může docházet k umlčování genů a DNA pak s těmito

geny přechází ze struktury euchromatinu do struktury heterochromatinu. Lokální i globální změny ve struktuře chromatinu buňka realizuje za pomoci faktorů, které remodelují chromatin. Histonové struktury a je ovlivňující enzymatické aktivity budou popsány v následujících odstavcích.

Základní jednotkou struktury chromatinu je nukleozóm, který je tvořený histonovými proteiny vázajícími vlákno DNA. Histony obsahují vysoké procento bazických aminokyselin, zejména lysinu a argininu, které interagují s fosfátovými skupinami na DNA. Tato vazba je prakticky nezávislá na dané sekvenci DNA, ačkoli některé práce naznačují, že například malý žlábek šroubovice DNA bývá přitocen k histonům v oblastech bohatých na adenin a thymin (Luger, Mader et al. 1997). Vazba DNA na histonové proteiny díky této nekovalentní interakci není pevná a umožňuje kupříkladu posun vlákna po histonovém oktameru.

Histony jsou globulární molekuly s výjimkou jejich nestrukturovaných N-konců. Tyto konce vyčnívají ze struktury nukleozómu a mohou být cílem enzymatických aktivit, které posttranslačně modifikují konkrétní aminokyselinové zbytky. Mezi nejběžnější posttranslační modifikace patří acetylace lysinu, methylace lysinu a argininu, fosforylace serinu a treoninu nebo ubiquitinace lysinu. Jedním z možných mechanismů, jakým mohou enzymatické aktivity remodelovat chromatin si uvedeme na příkladu posttranslační modifikace lysinu. Lysin je bazická aminokyselina, kdy po řízené acetylaci dochází ke snížení jejího kladného náboje, čímž se může destabilizovat vazba histonu se záporně nabitou molekulou DNA popř. destabilizovat interakce mezi histony. Snížení náboje aminokyselin histonů tedy může mít za následek rozvolnění struktury chromatinu. Dále mohou posttranslační modifikace aminokyselin histonových N-konců vytvářet signál pro vazbu nehistonových proteinů. Popsané nehistonové proteiny obvykle vyžadují pro společnou vazbu s histony konkrétní sled posttranslačních modifikací, který je někdy označován jako „histonový kód“. Existence „histonového kódu“ umožňuje velmi specifickou vazbu enzymů, které dále modifikují chromatinovou strukturu (Kouzarides 2007). Buňka může pomocí různých mechanismů ovlivňovat, jaké modifikace budou na N-koncích histonů v dané oblasti chromatinu, a tyto modifikace pak podle potřeby měnit. Většina modifikací je reverzibilní a v buňce najdeme enzymy, které dokáží posttranslační modifikace odstraňovat a vytvořit tak prostor pro tvorbu modifikací nových. V současnosti bylo několikrát prokázáno, že v transkripčně aktivním chromatinu se vyskytují specifické posttranslační modifikace histonů, které souvisejí s genovou expresí. Tyto modifikace se mohou měnit i se vzdáleností od promotoru daného genu kvůli nutnosti rozvolnění chromatinu pro snadnější přístup transkripčního aparátu k DNA. Zde je častá například acetylace nebo methylace histonu H3 na lysinu 4 (H3K4Me).

Podobně jako pro transkripčně aktivní rozvolněný chromatin, jsou pro kondenzované oblasti heterochromatinu typické modifikace, jež vedou k co nejkompaktnějšímu složení struktury. Mezi modifikacemi, které se vyskytují v heterochromatinu, můžeme nalézt např. trimethylace H3K9 a H3K27. V heterochromatinu se vyskytuje také linkerová DNA, která je bohatá na heterochromatinový protein 1 (HP1).

Nejprve se budu věnovat acetylaci. Acetylaci histonů zajišťují histonové acetyltransferázy (HAT), které mohou často modifikovat více lysinových zbytků na různých histonech. Jedná se o vratnou modifikaci, kdy deacetylaci zajišťují histonové deacetylázy (HDAC). Jak už bylo řečeno, acetylace histonových konců vede k rozvolnění chromatinu a jeho zpřístupnění pro další enzymy a faktory. Acetylace je častá v oblastech promotorů transkribovaných genů před nasednutím polymerázy, po dokončení transkripce jsou histony opět deacetylovány. Zde se jedná o velmi dynamický proces, kdy acetylace a deacetylace histonů umožňují průchod polymerázy a transkripci DNA. V době replikace dochází k acetylaci počátků replikace (anglicky origins) a acetylované histony najdeme také v místech zlomů DNA, kde umožňují přístup reparačním faktorům. Acetylace histonových N-konců je typická pro euchromatin a zde hlavně pro místa, kde se nachází exprimované geny. *In vitro* studie naznačují, že například acetylace lysinu v pozici 16 na histonu 4 (H4K16) brání vzniku 30 nm vlákna a tím i tvorbě vyšších kondenzovaných struktur heterochromatinu (Shogren-Knaak, Ishii et al. 2006). Acetylace je také důležitá pro vazbu dalších proteinů, které acetylované lysiny rozpoznávají pomocí své specializované proteinové domény – bromodomény. Patří mezi ně například faktory remodelující chromatin.

Dalším typem modifikace je methylace. Existují dvě možnosti methylace histonů, které rozlišujeme podle toho, jestli se methyluje arginin nebo lysin. Methylaci zajišťují methyltransferázy, které ji mohou provést na stejném aminokyselinovém zbytku i několikrát po sobě. Lysiny se mohou vyskytovat v mono, di i trimethylované formě a argininy v mono a dimethylované. Methyltransferázy často rozpoznávají pouze konkrétní lysin či arginin na daném histonu. Tato modifikace je taktéž vratná, o její odstranění se starají demethylázy. Methylace argininu pravděpodobně hraje roli při aktivaci genů, o čemž svědčí, že demethylázy najdeme u oblasti promotoru, kde methylace může být jedním z kroků aktivace exprese. Methylace lysinu může mít aktivační nebo naopak umlčovací funkci, např. methylace lysinu v pozici 9 na H3 (H3K9) vede k vazbě heterochromatinového proteinu 1, shrnuto v (Berger 2002). O tom zdali metylace lysinu bude aktivovat nebo umlčovat genovou expresi, rozhoduje její umístění. Ukazuje se, že methylace H3K4 a H3K36 se převážně vyskytuje v oblastech s aktivní genovou expresí a naopak methylace H3K9 nebo H3K27 vede k represí transkripce.

Methylace histonů nemění jejich náboj, nedá se tedy předpokládat, že by modifikace měla přímý vliv na změny ve struktuře chromatinu, jako už zmíněná acetylace. Na methylované lysiny a argininy se mohou vázat další proteiny pomocí mnoha různých domén, příkladem jsou Tudor, chromo nebo PHD (Plant Homeo Domain), shrnuto v (Zentner and Henikoff 2013).

Další z velmi běžných modifikací je fosforylace serinů a threoninů, kterou zajišťují kinázy a jejich odstranění pak fosfatázy. Přidání fosfátové skupiny na N-koncovou část histonu může mít podobný důsledek jako acetylace. Negativně nabitý fosfát bude odpuzovat DNA, protože její náboj je také negativní. Fosforylace je často spojována s aktivací genové exprese. Dále také může tato modifikace vést k vazbě dalších proteinů jako již zmíněná acetylace a methylace. Bylo zjištěno, že p42/p44 MAP (mitogen-aktivovaný protein) kinázová dráha, stejně jako stresem aktivovaná p38 dráha, může indukovat fosforylaci histonu H3 na serinu v pozici 10 na jeho N-konci, což vede k aktivaci transkripce tzv. immediate-early (okamžitě časných) genů, shrnuto v (Cheung, Allis et al. 2000). Fosforylované histony můžeme také najít v oblastech dvouvláknových zlomů na DNA, kde pravděpodobně usnadňují přístup pro reparační faktory (H2AX). Fosforylace zatím není tolik prozkoumaná jako již zmíněná acetylace nebo methylace. Ukazuje se ale, že ačkoli bývá často spojována s aktivací genové exprese, můžeme fosforylovaný histon H3S10 najít i ve struktuře vysoce kondenzovaných mitotických chromozomů, shrnuto v (Hans and Dimitrov 2001).

Acetylace, methylace a fosforylace se řadí mezi nejběžnější kovalentní modifikace histonových N-konců. Mezi méně běžnými posttranslačními modifikacemi histonů můžeme dále nalézt například ubiquitinaci nebo SUMOylaci. Bylo nalezeno více než 60 míst v molekulách histonů, na kterých se mohou modifikace vyskytovat, což jen dokazuje různorodost histonového kódu a složitost dějů odehrávajících se na molekule DNA. Právě tato variabilita umožňuje vytvoření histonového kódu složeného z různých modifikací, které pak specificky rozpoznávají další proteiny hrající roli v organizování struktury chromatinu. Mezi tyto patří tzv. na ATP závislé komplexy remodelující chromatin.

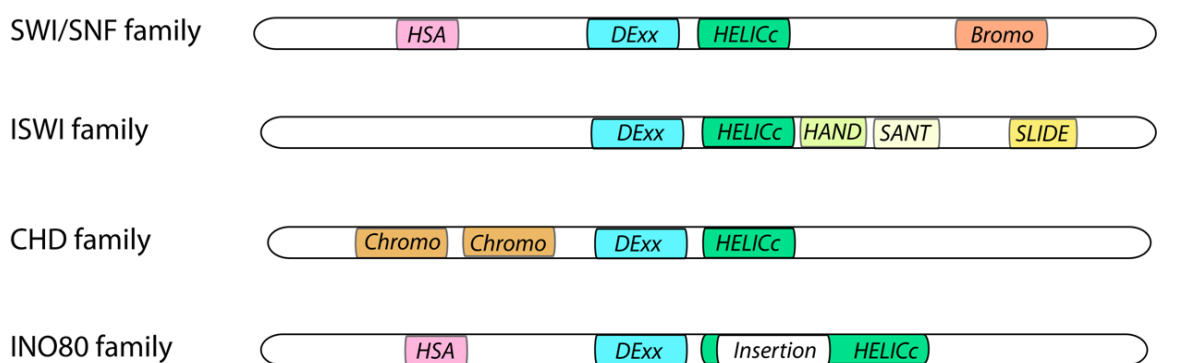
4 Komplexy remodelující chromatin v závislosti na ATP

Strukturu chromatinu ovlivňují z obecného hlediska dvě skupiny proteinů. První skupina zajišťuje posttranslační modifikace histonů kovalentní vazbou chemických skupin na jejich nestrukturované N-konce, jak bylo popsáno výše. Druhou skupinu tvoří faktory remodelující chromatin, které ke své činnosti využívají energii z hydrolýzy ATP. Takto získaná energie je těmito faktory využita k destabilizaci nekovalentních vazeb mezi histony a DNA. Existuje několik mechanismů, kterými tyto ATPázy mění strukturu chromatinu. Např. ATPázy patřící do rodiny SWI/SNF a ISWI mohou katalyzovat posun histonových oktamerů po vláknech DNA, a to až o 100 párů bází, shrnuto v (Becker 2002). Proces se někdy označuje jako klouzáni nukleozómů (anglicky sliding). Dále mohou remodelační faktory závislé na ATP odstraňovat nebo znovu vytvářet nukleozómy na „holé“ DNA. Zmíněný proces je v anglickém jazyce označován jako „nucleosome assembly“. Je důležité zmínit, že tyto faktory vyžadují další vazebné partnery, které rozšiřují jejich katalytickou funkci a/nebo substrátovou specifitu, a společně tak vytváří na ATP závislé chromatin remodelující komplexy.

Na ATP závislé enzymy remodelující chromatin náleží do rodiny SWI2/SNF2 (Switching defective and Sucrose non-fermenting) DNA dependentních ATPáz. Všechny tyto ATPázy spojuje konzervovaná helikázová ATPázová doména (anglicky helicase-like). Tato doména je tvořena dvěma kovalentně spojenými konzervovanými RecA podobnými (RecA-like) helikázovými doménami, přičemž ve žlábků mezi nimi se nachází místo pro vazbu a hydrolýzu ATP (Fairman-Williams, Guenther et al. 2010). Mimo této ATPázové domény obsahují SWI2/SNF2 enzymy řadu dalších domén, jejichž funkcí může být například rozpoznání specifických modifikací na histonech nebo kontakt s příslušnými interakčními partnery v remodelačním komplexu. Podle jednotlivých proteinových domén rozdělujeme chromatin remodelační faktory do čtyř podrodin: SWI/SNF, ISWI, CHD (Mi-2) a INO80.

Komplexy z podrodiny SWI/SNF (Switch/Sucrose nonfermenting) obsahují mimo konzervované ATPázové domény ještě C-koncovou bromodoménu, která může sloužit k rozpoznání acetylovaných lysinů na N-koncích histonů. Do této podrodiny patří mimo jiné kvasinková Snf2, nebo savčí BRM (Brahma) a BRG1 (Brahma-like 1). Podrodina ISWI (Imitation SWI) má na C-konci vazebné domény SANT a SLIDE (SANT-like domain), které obě pravděpodobně zajišťují rozpoznání modifikací a vazbu na histonové N-konce. Mezi savčí zástupce ISWI patří SNF2H a SNF2L. Další podrodinou je CHD (chromodomain helicase DNA binding), která se vyznačuje dvěma chromodomény na N-konci, které jí umožňují rozpoznat methylované zbytky na N-koncích histonů a vázat se na ně. Může

obsahovat také dvě PHD (Plant homeodomain) domény typu zinkových prstů (anglicky zinc finger-like domains), které také slouží k rozpoznání methylovaných aminokyselin na histonech (Marfella and Imbalzano 2007). Poslední podrodina INO80 (Inositol requiring mutant 80) je charakterizována velmi dlouhou inzercí v ATPázové doméně, která je přibližně 300 aminokyselin dlouhá a je výrazně delší, než inzerce které v ATPázové doméně obsahují ostatní podrodiny. Podle studie *in silico* může obsahovat doménu DBINO (DNA binding domain of INO80), která se nachází před ATPázovou doménou a pravděpodobně slouží k vazbě DNA (Bakshi, Prakash et al. 2004).



Common domains	Function	Unique domains	Function
DExx	nucleic acid binding and ATP hydrolysis	Bromo	recognizes acetylated lysines in histone tails
HELICc		Chromo	binds methylated lysines in histone tails
		HAND	recognizes nucleosomes and internucleosomal DNA
		SANT	
		SLIDE	
		HSA	binds actin-related proteins

(převzato z: (Manelyte and Längst 2013))

Obr. 2: Přehled podrodin faktorů remodelujících chromatin z rodiny SWI2/SNF2. Zástupci jednotlivých podrodin se liší složením funkčních domén v jejich proteinové molekule. DExx a HELICc mají DNA vazebnou funkci a slouží k hydrolýze ATP. Bromodoména slouží k rozeznávání acetylovaných lysinů na histonech. Chromodoména slouží k rozeznávání methylovaných lysinů na histonech. Domény HAND, SANT a SLIDE pomáhají rozeznávat nukleozómy a linkerovou DNA mezi nimi.

Jak už bylo řečeno, faktory remodelující chromatin vyžadují často ke své funkci přítomnost dalších partnerských molekul, se kterými vytváří tzv. chromatin remodelující komplexy. Vzhledem k zaměření naší laboratoře a plánovaným projektům magisterského studia bych se dále chtěla v textu věnovat faktorům z podrodiny ISWI a to hlavně jejímu zástupci proteinu Smarca5 (Snf2h). Nyní se budu podrobněji zabývat popisem chromatin remodelujících komplexů, jejichž katalytickou podjednotku tvoří právě protein Smarca5, jmenovitě: ACF, CHRAC, RSF, WICH a NoRC, a rozvedu roli těchto komplexů v nádorové biologii. Závěrečná část textu pak popíše transgenní nebo deleční zvířecí modely, jimž jsou specificky aktivovány nebo odstraněny geny pro chromatin remodelující faktory a možný přínos výsledků těchto experimentů k lepšímu pochopení vzniku, progresu a léčby nádorových onemocnění.

4.1 Komplex ACF

Komplex ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor) se skládá z ISWI ATPázy Smarca5 a proteinu Acf1 (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor 1). Protein Acf1 má dvě PHD domény a jednu bromodoménu, které mohou asociovat s methylovanými lysinovými zbytky na histonech, a obsahuje dvě konzervované oblasti (WAC a WAKZ) (Ito, Levenstein et al. 1999). N-terminální WAC doména pravděpodobně slouží k vazbě na DNA. Protein také obsahuje DDT doménu, která interaguje s proteinem Smarca5 (Fyodorov and Kadonaga 2002).

In vitro studie naznačují, že protein Smarca5 se v komplexu s proteinem Acf1 chová odlišným způsobem než samostatně. Protein Acf1 pravděpodobně ovlivňuje vazebnou specifitu Smarca5, což má za následek, že v komplexu ACF vyžaduje pro svou vazbu delší rozestupy mezi jednotlivými nukleozómy na DNA. Samostatný protein Smarca5 je schopen nasedat do různě dlouhých mezer mezi nukleozómy a nečiní mezi těmito délkami rozdíly. Protein Smarca5 má v komplexu ACF také o něco větší účinnost při vytváření rovnoměrných rozestupů mezi nukleozómy (He, Fan et al. 2006). Komplex ACF je schopen remodelovat nukleozómy asi šestkrát rychleji, než samotný protein Smarca5. Toto měření probíhalo rovněž *in vitro*. Komplex ACF má také na rozdíl od proteinu Smarca5 tendenci hýbat s nukleozómy směrem ke středu molekuly DNA, i když je termodynamicky výhodnější, aby byly umístěny na koncích (Yang, Madrid et al. 2006). Samotný protein Smarca5 má naopak tendenci nukleozómy posouvat směrem ke koncům vlákna (Strohner, Wachsmuth et al. 2005). Další experimenty naznačují, že vyšší účinnost proteinu Smarca5 v komplexu s proteinem Acf1 při posouvání vlákna DNA po histonech vyžaduje přítomnost proteinových domén PHD v

molekule Acf1. Pokud tyto domény z proteinu odstraníme, účinnost komplexu se sníží, přestože je nadále schopen vázat nukleozómy se stejnou efektivitou (Eberharter, Vetter et al. 2004).

Rovnoměrné rozestupy mezi nukleozómy jsou jedním ze znaků heterochromatinu. Komplex ACF, který tyto rozestupy vytváří, je tedy spojován s umlčováním genů a vytvářením heterochromatinových struktur. U octomilky obecné (latinsky *Drosophila melanogaster*) s mutovaným genem pro protein Acf1 se ukázalo, že snížená hladina proteinu Acf1 vede k problémům při tvorbě heterochromatinu. To se projevuje nepravidelnými rozestupy mezi nukleozómy, které jsou v průměru menší, než by byly u divokého typu. Snížená exprese proteinu Acf1 vedla k poklesu umlčování genové exprese pomocí takzvaných Polycomb proteinů (Fyodorov, Blower et al. 2004). Zjištění, že komplex ACF hraje roli při umlčování genů, podporuje také fakt, že se váže na histon macroH2A, což je modifikovaný histon H2A. Histon macroH2A se nachází v inaktivovaném chromozomu X u samičích buněk savců a má proti histonu H2A přibližně dvakrát delší C-koncovou doménu. Přestože většina komplexů remodelujících chromatin se nedokáže vázat na struktury obsahující macroH2A, u komplexu ACF byla tato vazba prokázána. Ukazuje se, že schopnost vazby komplexu ACF na chromatinovou strukturu, která obsahuje histon macroH2A se neliší oproti struktuře obsahující histon H2A. Z popsaného lze usuzovat, že interakce histonu macroH2A a s komplexem ACF, může hrát roli při inaktivaci jednoho ze dvou chromozomů X u samičích buněk savců (Chang, Ferreira et al. 2008).

Další práce popisují účast komplexu ACF v procesu replikace, kde pravděpodobně pomáhá při průchodu replikační vidličky (anglicky replication fork) vysoce kondenzovanou strukturou heterochromatinu. U buněk HeLa se sníženou hladinou proteinu ACF1 bylo pozorováno, že nejsou schopné dokončit replikaci DNA a jejich buněčný cyklus je zastaven v pozdní S fázi, která je charakterizována právě syntézou DNA oblastech heterochromatinu (Collins, Poot et al. 2002). Předpokládá se, že další funkcí komplexu ACF je asistence při opravách DNA, protože byla pozorována akumulace a kolokalizace proteinů Smarca5 a Acf1 v oblastech dvouvláknových zlomů, a to už během několika sekund od poškození DNA. Buňky se sníženou hladinou komplexu ACF, byly velmi náchylné k poškození způsobenému ionizujícím zářením a látkami, které vyvolávají dvouřetězcové zlomy (Lan, Ui et al. 2010). Ukazuje se, že protein Acf1 hraje dále roli při kontrole pro přechod z fáze G2 do fáze M buněčného cyklu (anglicky G2/M checkpoint). Buňky HeLa se sníženou expresí proteinu ACF1, jež byly vystaveny ionizujícímu záření, nebyly schopné tuto kontrolu dokončit a

vstupovaly do apoptózy (Sanchez-Molina, Mortusewicz et al. 2011). Zatím nebyla popsána přímá souvislost komplexu ACF s nádorovým onemocněním.

4.2 Komplex CHRAC

Dalším komplexem, který obsahuje proteiny Acf1 a Smarca5, je komplex CHRAC (Chromatin accessibility complex). Lidský komplex CHRAC obsahuje, mimo proteinů SMARCA5 a ACF1, ještě dvě domény CHRAC-15 a CHRAC-17 (Poot, Dellaire et al. 2000). U *D. melanogaster* byla, mimo homologů těchto dvou podjednotek CHRAC-14 a CHRAC-16, izolována ještě další podjednotka - topoisomerase II (Varga-Weisz, Wilm et al. 1997). Přítomnost topoisomerase jako podjednotky CHRAC u člověka však nebyla potvrzena (Poot, Dellaire et al. 2000). Proteiny CHRAC-15 a CHRAC-17 interagují s N-koncem proteinu ACF1 pouze ve formě heterodimeru. Komplex CHRAC využívá podobné mechanismy remodelace struktury chromatinu jako komplex ACF. Je schopný posouvat nukleozómy směrem do středu vlákna, kde mezi nimi vytváří rovnoměrné rozestupy. Podjednotky CHRAC-15 a CHRAC-17 tuto funkci nemění, ale zvyšují účinnost posunu. Za přítomnosti těchto dvou podjednotek v komplexu CHRAC byla rychlost posunu nukleozómů dvakrát až třikrát vyšší oproti komplexu ACF. Tento efekt byl pozorován pouze pokud byly přítomny obě podjednotky, pro jejich funkci je tedy pravděpodobně nutná dimerizace (Kukimoto, Elderkin et al. 2004). Struktura proteinů CHRAC-14 a CHRAC-16, homologů savčích proteinů CHRAC-15 a CHRAC-17 u *D. melanogaster*, je velmi podobná struktuře histonů a to včetně nestrukturovaných N- a C-konců. Jejich heterodimer se značně podobá dimeru histonů H2A a H2B. V experimentech s vnášením proteinů CHRAC-14 a CHRAC-16 do nukleozómu však bylo zjištěno, že inkorporace tohoto dimeru vzhledem k nízké stabilitě výsledného komplexu nebyla možná (Hartlepp, Fernandez-Tornero et al. 2005). Experimenty založené na pozorování ontogeneze *D. melanogaster* naznačují, že komplex CHRAC je důležitý pouze v časném stádiu embryonálního vývoje. Vysoká koncentrace komplexu CHRAC byla pozorována jen během prvních několika hodin vývoje, už po 6 hodinách začala jeho proteinová hladina klesat až na 5-10% z počátečního množství. Přítomnost komplexu CHRAC pouze během časného stádia vývoje naznačuje jeho možnou roli v procesu buněčné diferenciace (Corona, Eberharter et al. 2000). Přímá souvislost komplexu CHRAC s nádorovým onemocněním nebyla do této doby popsána.

4.3 Komplex RSF

Komplex RSF (Remodeling and spacing factor) je tvořen dvěma podjednotkami, a to proteiny Smarca5 a Rsf-1 (Remodeling and spacing factor 1). Protein Rsf-1 obsahuje PHD doménu a C-koncově lokalizovanou oblast bohatou na kyselinu glutamovou a asparagovou (Loyola, Huang et al. 2003). Protein Rsf-1 dále obsahuje DDT doménu, která pravděpodobně slouží k interakci s proteinem Smarca5 (Sheu, Choi et al. 2008). Jedním z mechanismů, jakými komplex RSF mění strukturu chromatinu, je vytváření rovnoměrných rozestupů mezi nukleozómy (LeRoy, Orphanides et al. 1998). Některé další studie *in vitro* naznačují roli komplexu RSF v de novo chromatinizaci, tedy sestavování (anglicky assembly) nukleozómů na vlákne DNA. Reakce je závislá na energii hydrolýzy molekuly ATP. Ukazuje se, že komplex RSF pravděpodobně nevyžaduje ke své funkci interakci s histonovými chaperony, protože sám může funkci podobnou chaperonu plnit. Komplex se váže na oktamer histonů H3 a H4 a to nezávisle na modifikacích na jejich nestrukturovaných N-koncích. Pro jeho funkci, tedy posouvání nukleozómu po vlákne, je však nezbytně nutná acetylace histonových konců na specifických místech, a to u histonů H4 a dimeru H2A a H2B. Acetylace H3 má na reakci naopak inhibiční vliv (Loyola, LeRoy et al. 2001).

Při výzkumu prováděném na *D. melanogaster* se ukázalo, že komplex RSF může hrát roli při umlčování exprese genů. Komplex RSF katalyzuje záměnu histonu H2A za jeho variantu H2Av, která bývá spojována se strukturou heterochromatinu. Jedinci se sníženou hladinou proteinu Rsf-1 vykazovali menší počet molekul histonu H2Av v chromatinu (Hanai, Furuhashi et al. 2008). Další funkcí komplexu RSF může být asistence při formaci centromery, kde pomáhá při začleňování CENP-A (Centromere protein A) do chromatinu (Perpelescu, Nozaki et al. 2009).

Byla prokázána souvislost mezi komplexem RSF a různými typy nádorových onemocnění. Vysoké hladiny proteinu Rsf-1 byly naměřeny např. v buňkách karcinomu vaječníků (Shih Ie, Sheu et al. 2005). Na myším modelu bylo pozorováno, že protein Rsf-1 je důležitý pro proliferaci tumoru. Po řízené nadprodukci proteinu Rsf-1 v nádorových buňkách docházelo ke zvýšenému nárůstu nádorové hmoty oproti kontrole. Protein Rsf-1 byl z nádorových buněk vaječníků koimunoprecipitován spolu s proteinem Smarca5, což naznačuje, že i v těchto buňkách pravděpodobně vyskytuje v komplexu RSF. V nádorových buňkách byla naměřena zvýšená koncentrace proteinu Smarca5, ačkoliv hladina mRNA pro tento protein zůstala oproti kontrole neměnná. Výsledky práce naznačují, že protein Rsf-1 pravděpodobně stabilizuje protein Smarca5 tvorbou komplexu RSF a brání tak jeho degradaci. Jedním z možných mechanismů popsané progresy nádorového onemocnění po

indukci genu pro Rsf-1 je, že protein Rsf-1 vyvazuje protein Smarca5 v nádorových buňkách a tím inhibuje tvorbu dalších remodelačních komplexů obsahujících protein Smarca5. Vyvazování proteinu Smarca5 komplexem RSF může pravděpodobně narušit rovnováhu buněčných procesů a ovlivnit tak protinádorové mechanismy buňky (Sheu, Choi et al. 2008). Vliv zvýšené exprese proteinu Rsf-1 na netransformované buňky byl ukázán při extrémním intracelulárním zvýšení hladiny proteinu Rsf-1, jež může vést ke vzniku zlomů na vlákne DNA, k zastavení proliferace a vstupu buněk do apoptózy. Autoři práce v dalších experimentech popisují chování proteinu Rsf1 jako onkogenu, kdy kontinuálně indukované zvyšování jeho proteinové hladiny vyvolává poškození a destabilizaci DNA, jež může vyústit až v nádorovou transformaci buněk (Sheu, Guan et al. 2010).

4.4 Komplex NoRC

Komplex NoRC (Nucleolar remodeling complex) se skládá z ATPázy Smarca5 a proteinu Tip5 (Transcription termination factor 1 (Ttf1) – interacting protein 5). Protein Tip5 obsahuje domény PHD, bromo, DDT, TAM a čtyři AT-háčky (anglicky AT-hooks). Domény TAM a AT-hooks mají funkci při vazbě proteinu na DNA, doména DDT slouží k interakci s proteinem Smarca5 (Strohner, Nemeth et al. 2001). Domény PHD a bromodoména, hrají roli ve vazbě posttranslačně modifikovaných histonů v chromatinu. Některé studie naznačují, že bromodoména proteinu Tip5 specificky rozpoznává acetylovaný H4K16 a popsaná modifikace lysinu 16 je nezbytná pro vazbu komplexu NoRC na strukturu chromatinu (Zhou and Grummt 2005).

Komplex NoRC se nachází především v jadérku, kde hraje roli v inhibici přepisu genů RNA polymerázou I. Komplex NoRC se váže přímo do promotorových oblastí genů kódujících ribozomální RNA (rDNA), kde se účastní umlčování jejich transkripce a tvorby heterochromatinu (Zhou and Grummt 2005). Při umlčování rDNA využívá komplex NoRC deacetylaci histonů, tedy mechanismu odstraňování posttranslační modifikace, jež souvisí s aktivní genovou expresí. Protein Tip5 interaguje pomocí své PHD a bromodomény přímo s histonovou deacetylázou a přináší její enzymatickou aktivitu do oblastí promotorů pro rRNA (Zhou, Santoro et al. 2002). Ukazuje se, že komplex NoRC může nepřímo přinášet i další enzymatické aktivity do umlčovaných oblastí; např. histonové methyltransferázy a DNA methyltransferázy, které se dále účastní procesu remodelace a vytvoření transkripčně inhibiční chromatinové struktury (Santoro, Li et al. 2002). Dalším mechanismem, který komplex NoRC využívá k umlčování rDNA, je ovlivnění posunu nukleozómů. Komplex NoRC je schopen katalyzovat posun nukleozómu po vlákne DNA po navázání do oblasti promotoru (přesněji

dochází k posunu o 25 bází směrem ke start-kodónu). Kvůli tomuto posunu se oblast důležitá pro iniciaci transkripce stane pravděpodobně méně přístupnou pro transkripční faktory a dojde k umlčení exprese genu (Li, Langst et al. 2006). Snížení hladiny proteinu Tip5 v buňkách pomocí vnesení dvouvláknové RNA (dsRNA) nebo microRNA (miRNA) indukuje zvýšenou expresi rDNA, která je doprovázena nízkým zastoupením heterochromatinu v této oblasti. Bylo pozorováno, že buňky deficientní na protein Tip5 proliferují rychleji oproti kontrole a některé vykazují známky nádorové transformace, jež je doprovázena nekontrolovaným buněčným množením v kultuře. Z popsaného vyplývá, že pozorování změn proteinových hladin molekuly Tip5 může být významné i z hlediska nádorové biologie (Guettg, Lienemann et al. 2010). Komplex NoRC může také hrát roli při formaci centromery v průběhu mitózy. Tomu nasvědčuje skutečnost, že protein Tip5 přímo interaguje s proteinem CENP-A (Centromere protein A) v oblasti centromer (Guettg, Lienemann et al. 2010).

4.5 Komplex WICH

Komplex WICH (WSTF–ISWI chromatin remodeling complex) se skládá z proteinů Smarca5 a WSTF (Williams syndrome transcription factor). Protein WSTF obsahuje N-koncově situovanou konzervovanou doménu WAC, která slouží k vazbě na DNA, následovanou DDT doménou interagující s proteinem Smarca5. Dále vlastní konzervovanou doménu WAKZ, doménu PHD a C-koncovou bromodoménu, které, jak už bylo popsáno, interagují s posttranslačně modifikovanými aminokyselinami na N-koncích histonových molekul (Bozhenok, Wade et al. 2002).

Jednou z funkcí komplexu WICH by mohla být účast při replikaci DNA. Tuto možnost podporuje fakt, že komplex WICH *in vitro* interaguje se svorkovým (anglicky clamp) proteinem PCNA (Proliferating cell nuclear antigen). Protein PCNA zvyšuje procesivitu polymerázy v průběhu replikace. Komplex WICH pravděpodobně udržuje chromatin v rozvolněné podobě, která umožňuje přístup proteinům potřebným pro replikaci DNA během S fáze buněčného cyklu. Indukované snížení hladiny proteinu WSTF vede k formaci heterochromatinu, a to i u právě vznikající DNA (Poot, Bozhenok et al. 2004). Komplex WICH také může hrát roli při transkripci RNA polymerázou I a III a to ve formě multiproteinového komplexu označovaného B-WICH, který obsahuje RNA a některé jaderné proteiny. Pro tvorbu komplexu B-WICH je nutné, aby probíhala aktivní transkripce, přítomnost 45 S rRNA, 5 S rRNA a 7SL RNA, jako podjednotek komplexu, naznačuje účast komplexu B-WICH při transkripci genů RNA polymerázou I a III. Mezi další proteiny, které se nachází v komplexu B-WICH patří například RNA helikáza II/GUα a Myb-bp1a, které jsou

typické pro jadérko a jejich přítomnost v komplexu B-WICH také naznačuje účast tohoto komplexu při tvorbě rRNA. Přítomnost proteinu NM1 (Nuclear myosin 1) dále zvyšuje pravděpodobnost účasti komplexu B-WICH při transkripci RNA polymerázou I, protein NM1 interaguje s RNA polymerázou I během transkripce (Cavellan, Asp et al. 2006). Interakce komplexu WICH s proteinem NM1 byla detekována i v další studii, ve které autoři popisují, kolokalizaci proteinu NM1 s komplexem B-WICH v místech aktivní transkripce rRNA polymerázou I (Percipalle, Fomproix et al. 2006).

Při studii prováděné *in vitro* byla objevena tyrosin kinázová aktivita faktoru WSTF, který má schopnost fosforylovat tyrosin na pozici 142 na histonu H2A.X. Za kinázovou aktivitu pravděpodobně odpovídá N-koncová WAC doména spolu s v této studii nově pozorovaným C-koncovým motivem (Xiao, Li et al. 2009). Defosforylace histonu H2A.X(Y142), kterou provádí fosfatáza EYA (Eyes absent), je pravděpodobně signálem pro opravu v místech dvouřetězcových zlomů na DNA (Krishnan, Jeong et al. 2009). Komplex WICH tedy hraje pravděpodobně roli při signalizaci oprav DNA a to díky své schopnosti fosforylovat tyrosin na pozici 142 histonu H2A.X.

Gen pro protein WSTF je jedním z genů deletovaných u Wiliamsova syndromu. Příčinou tohoto syndromu je delece přibližně 28 genů na jednom chromozomu 7 (oblast 7q11.23), přičemž jedním z nich je právě gen pro protein WSTF. Jedná se o multisystémovou vývojovou poruchu, která postihuje kardiovaskulární systém, pojivové tkáně (je deletován například gen pro elastin) a centrální nervovou soustavu (což často způsobuje mentální retardaci). Také má za následek charakteristickou podobu obličeje označovanou „elfin face“ (česky obličej skřítky) díky širokému čelu, vypouklým tvářím, úzkým očním štěrbinám a velikým ústům s plnými rty. U pacientů je také pozorována hyperkalcémie, shrnuto v (Martens 2013). Na myším modelu bylo prokázáno, že delece jedné alely genu pro protein WSTF, má za následek hyperkalcémii a srdeční poruchy, které najdeme u pacientů s Williamsovým syndromem, viz kapitola myší modely.

5 Myší modely

V přecházející kapitole bylo popsáno, že se jeden na ATP závislý chromatin remodelující faktor může nacházet v mnoha proteinových komplexech a jako součást těchto komplexů se účastnit mnoha odlišných, a v některých případech i protichůdných, dějů. Vzhledem k velikosti lidského popř. savčího genomu je zřejmé, že regulace aktivity proteinových komplexů je velmi komplikovaný a vzájemně provázaný proces, který musí být buňkou velice přesně regulován. Pokud dojde k narušení přesné regulace chromatinové struktury, vzniká prostor pro vznik patologických jevů, jež mohou vést v extrémních případech až k nádorové transformaci, popř. k aktivaci apoptotických drah. Z mnohých studií *in vitro* získáváme představu o mechanismu účinku a vlivu konkrétního komplexu remodelujícího chromatin na strukturu chromatinu. Ve většině případů se však jedná buď o nebuněčný systém, popřípadě velmi specifickou, nefyziologickou a uměle vytvořenou změnu na úrovni buňky, jež byla způsobena extrémním zásahem. Je proto velice komplikované si představit, jaký vliv nebo funkci může mít chromatin remodelační komplex pro buňku v tkáňovém kontextu a pro organismus celkově. Pro zodpovězení těchto otázek se využívá zvířecích modelů, kterým byla exprese faktoru/komplexu remodelujícího chromatin geneticky upravena. Zejména pak savčí zvířecí (např. myší) modely mohou zodpovědět nejen otázky týkající se funkce remodelátorů u člověka, ale také mohou sloužit jako vhodný model pro studium genetických a epigenetických onemocnění spojených s poškozením genů pro tyto molekuly.

Současné studie naznačují, že například delece jedné alely genu pro chromatin remodelační faktor SNF5 (patřící do rodiny SWI/SNF) může být pravděpodobnou příčinou vzniku maligního rhabdomyosarkomu. Toto velmi agresivní nádorové onemocnění postihuje děti v raném věku a nádorovou masu u nich můžeme nalézt v různých orgánech, především však v ledvinách, mozku a měkkých tkáních (Versteeg, Sevenet et al. 1998). Další studie zabývající se detekcí mutací chromatin remodelačních faktorů u některých nádorových onemocnění ukazují, že mutace v genu pro protein Brg1 se nachází v karcinomech plic, prostaty, prsu a slinivky. To značí, že tento faktor může fungovat jako supresor vzniku nádorových onemocnění (Wong, Shanahan et al. 2000). Při studiu myšího modelu s heterozygotní delecí genu pro protein Brg1 byla nalezena souvislost mezi tímto genotypem a vznikem epitelových tumorů. Faktor Brg1 patří také do rodiny SWI/SNF (Bultman, Gebuhr et al. 2000). Mezi další chromatin remodelační faktory podrodiny SWI/SNF, jež byly spojeny s nádorovým onemocněním, patří protein Brm. Ve studii prováděné na buněčných liniích, které

byly odvozeny od karcinomu žaludku, byl pozorován signifikantní pokles hladiny faktoru Brm oproti kontrolním buňkám (Yamamichi, Inada et al. 2007).

V následujících kapitolách bych chtěla popsat současné modely vytvořené pro výzkum funkce proteinu Smarca5 a na proteinu Smarca5 závislých remodelačních komplexů. Fyziologicky je protein Smarca5 exprimován prakticky každou buňkou těla, ale některé tkáně vyžadují jeho vyšší proteinovou úroveň, například ledviny, varlata a kostní dřeň, kde jeho vysoké intracelulární hladiny nalezneme především v hematopoetických progenitorech. Během diferenciaci pak dochází k poklesu exprese proteinu Smarca5. Z experimentů prováděných mimo jiné také v naší laboratoři bylo zjištěno, že zvýšená hladina proteinu Smarca5 může souviset s patologickými stavy. Byla pozorována zvýšená exprese tohoto proteinu v CD34 pozitivních progenitorech během procesu diferenciaci u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML). Poté, co u pacientů došlo k úplné hematologické remisi, došlo také k poklesu hladiny proteinu Smarca5 (Stopka, Zakova et al. 2000). V následujících odstavcích bych chtěla shrnout současné znalosti z oblasti myších modelů delece proteinů rodiny ISWI, jmenovitě Smarca5 a Smarca1, a některých jejich interakčních partnerů, které pomohou lépe pochopit funkci těchto chromatin remodelujících faktorů ve vývoji organismu a tkáňové diferenciaci.

5.1 Modely pro protein Smarca1

Protein Smarca1 patří do rodiny ISWI a je z 80% homologický s proteinem Smarca5, což vedlo ke spekulacím, zdali nejsou jejich nepřítomnost je vzájemně nahraditelná (kompenzovatelná). Tato domněnka se však dosud nepotvrdila, protože nebyla prokázána přítomnost těchto dvou proteinů ve stejném komplexu. Oba proteiny interagují s odlišnými molekulami a z expresních analýz je patrné, že ani jejich funkce pravděpodobně není redundantní. Zatímco protein Smarca5 je exprimován téměř ve všech tkáních, mRNA proteinu Smarca1 byla nalezena pouze ve vyvíjejícím se mozku a gonádách. Pro lepší pochopení funkce proteinu Smarca1 v diferencující mozkové tkáni a případné nalezení společných a vzájemně nahraditelných chromatin remodelačních aktivit s proteinem Smarca5, byl vytvořen model s delecí exonu 6 v genu pro protein Smarca1. Exon 6 kóduje ATP-vazebný motiv, který je esenciální k zajištění enzymatické funkce proteinu. Po jeho tkáňově řízené delecii nedochází k posunu čtecího rámce a vzniká stabilní protein Smarca1, který není schopen vázat ATP. Myši s genotypem *Smarca1(Ex6) -/-* jsou životaschopné a nevykazují výrazné rozdíly v chování ani fyziologii oproti kontrolám, patrné je však zvětšení neurocrania. Homozygotní jedinci na mutaci Ex6 vykazují abnormality v morfologii mozku,

jejich příčinou je akcelerovaná buněčná proliferace. V mozkové tkáni zvířat bylo pozorováno vyšší procento buněk v S a M fázi buněčného cyklu a vyšší počet proliferujících progenitorů neokortexu, a to především v 13,5 až 17,5 embryonálních dni (E13,5-E17,5) oproti kontrole. Pro detekci S fáze buněčného cyklu bylo využito metody inkorporace thymidinového analogu BrdU do DNA. U embryí s genotypem *Smarca5(Ex6)*^{-/-} byly dále pozorovány vyšší hladiny proteinu Foxg1, molekuly jež je specificky exprimována v aktivně proliferující mozkové tkáni a s jejíž diferenciací intracelulární hladina proteinu Foxg1 klesá. Tato data naznačují, že chromatin remodelační aktivita proteinu Smarca1 hraje významnou roli v umlčování genů spojených s aktivní proliferací progenitorů neuronů a jeho odstranění může vést až k zablokování diferenciaci a neřízenému buněčnému dělení (Yip, Corcoran et al. 2012).

5.2 Modely pro protein Smarca5

Jedním z prvních modelových organismů proteinu Smarca5 je myš s delecí genu této ATPázy v myším organismu. Při genové inaktivaci (anglicky knock-out) dojde k odstranění příslušné kódující části genu, za použití technik molekulárního klonování, a to tak aby následně přepis genu vedl k produkci nestabilní molekuly mRNA nebo mRNA s posunem čtecího rámce. V každém případě je cílem zamezit vzniku funkčního proteinového produktu. Model s klasickou delecí "knock-out" genu pro protein Smarca5 byl vytvořen delecí exonů 5 až 9a, které mimo jiné kódují katalytickou doménu ATPázy. Bylo zjištěno, že potomci po křížení heterozygotů pro popsanou delecí produkují potomstvo s genotypem rodičů (heterozygot) nebo s oběma intaktními alelami pro gen *Smarca5*. Potomci nesoucí obě alely typu "knock-out" se nerodily. K dalšímu výzkumu byly odebrány blastocysty z oplodněných heterozygotních *Smarca5* ^{+/-} samic, u kterých byl zjištěn genotypováním normální Mendelovský štěpný poměr pro F1 generaci při křížení dvou heterozygotů. Jedna čtvrtina blastocyst měla genotyp *Smarca5* ^{-/-}. *Ex vivo* kultivací těchto blastocyst byla prokázána letalita genotypu, kdy přibližně po 48 hodinách byla patrná vývojová degenerace (což odpovídá období prvních 24 hodin po implantaci do dělohy) a mortalita 3 až 6 den kultivace. Výsledky ukazují esenciální vliv ATPázy Smarca5 na raný embryonální vývoj. Dále byla prokázána přítomnost proteinu Smarca5 v embryonálních kmenových buňkách vnitřní buněčné masy (anglicky Inner Cell Mass) blastocysty. Při kultivaci kmenových buněk derivovaných z blastocyst s genotypem *Smarca5* ^{-/-} byla pozorována inhibice proliferace. Heterozygotní kmenové buňky embrya i trofoblastu s genotypem ^{+/-} byly schopné dělení *ex vivo* (Stopka and Skoultschi 2003).

Další práce využívající blastocysty s genotypem *Smarca5* $-/-$ naznačují významný úbytek zastoupení heterochromatinu vůči euchromatinu oproti kontrolním buňkám. Tento jev byl v menší míře zaznamenán i u myši s heterozygotním genotypem *Smarca5* $+/-$ oproti buňkám s oběma intaktními alelami genu (*Smarca5* $+/+$). Heterozygotní linie vykazovala úbytek acetylovaných lysinů v pozici H3K9Ac a zároveň dimethylovaných lysinů H3K79Me2 oproti kontrolním myším. Z popsaného vyplývá, že distribuce těchto posttranslačních modifikací může částečně záviset na funkci proteinu Smarca5. H3K9Ac a H3K79Me2 jsou modifikace spojované rozvolněnou strukturou euchromatinu (Vargova, Vargova et al. 2009).

Nepostradatelnost proteinu Smarca5 v embryonálním vývoji, byla pozorována také u myších embryí, kterým byla injikována dsRNA pro protein Smarca5. Ačkoli asi polovina těchto embryí byla schopná se vyvinout až do stádia moruly, zbylá polovina byla vývojově blokována na úrovni dvou až osmibuněčného zárodku (Torres-Padilla and Zernicka-Goetz 2006).

Vzhledem k letalitě homozygotního genotypu *Smarca5* $-/-$ v embryonálním vývoji, byl pro potřeby další postnatální charakterizace funkce genu, vytvořen v naší laboratoři myší model s tkáňově determinovanou delecí exonu 5 genu pro protein Smarca5. Exon 5 byl vybrán na základě jeho malé velikosti, jež je vyžadována pro zachování efektivity procesu homologní rekombinace katalyzovanou rekombinázou Cre, a z důvodů možnosti vytvoření posunu čtecího rámce ve výsledné zkrácené molekule mRNA. Myší model je v současné době využíván pro delecí proteinu Smarca5 v myší hematopoetické kmenové buňce, pro niž je typický aktivní promotor genu *Vav1*. Embrya nesoucí obě kondicionálně deletovatelné alely genu pro protein Smarca5 a transgenní expresor rekombinázy Cre pod promotorem *Vav1*, umírají 18,5 den embryonálního (E18,5) vývoje. V čase E13,5 jsou rozpoznatelná od embryí heterozygotních nebo divokého typu a to díky menšímu vzrůstu a anemickému koloritu. Selhání vývoje hematopoetických progenitorů je doprovázeno změnou koloritu a velikosti hlavního embryonálního hematopoetického orgánu - jater. Model poskytuje nenahraditelnou informaci o roli proteinu Smarca5 v krvetvorbě a nabízí možnost k dalšímu studiu vlivu delece na diferencovanější stádia hematopoetických progenitorů. Data popisující tento myší model s tkáňově determinovanou delecí genu pro protein Smarca5, zatím nebyla publikována.

Dalším myším modelem pro protein Smarca5 je linie MommeD4 (Modifier of murine metastable epiallele Dominant 4). Ta nese ve svém genomu bodovou mutaci v genu pro protein Smarca5, jedná se o záměnu adeninu za thymin, která se nachází v exonu 12. Tato mutace vede k nekonzervativní záměně aminokyseliny, původní hydrofobní tryptofan je zaměněn za bazický arginin. K tomu dochází v evolučně velmi konzervované α -helixové části

helikázové domény proteinu Smarca5. Je nepravděpodobné, že popsaná mutace brání správnému složení proteinu, ale může ovlivnit jeho lokální strukturu a schopnost proteinu interagovat s dalšími molekulami. Stejně jako u předchozího modelu je mutace v homozygotní formě letální a homozygotní embrya odumírají ve velmi časně fázi svého vývoje. Heterozygoti pro tuto mutaci přežívají bez známek vlivu na ontogenezi, ale vykazují subtilnější fenotyp oproti kontrole. Vážením bylo zjištěno, že heterozygoti mají v průměru o 10% nižší hmotnost než jedinci divokého typu. U tohoto myšího modelu byl zjištěn efekt paternálního přenosu epigenetické informace, jak bych chtěla opsat dále. Protein Smarca5 hraje roli při spermatogenezi, kdy je přítomen ve spermatocytech od profáze I až do fáze VII – pachytene, tedy před rozchodem homologních alel do haploidních gamet. Epigenetické modifikace vzniklé v této fázi spermatogeneze ovlivní expresi z chromozomů vstupujících do gamet a to ať už tyto gamety ponesou mutantní alelu, nebo alelu divokého typu (Chong, Vickaryous et al. 2007). Z celkem 42 myších linií MommeD existují ještě další dvě, které mají mutaci v genu pro protein Smarca5. První je linie MommeD35, která má bodovou mutaci ve formě záměny adeninu za guanin v exonu 9. Druhou je linie MommeD37, která má také bodovou mutaci, tentokrát se jedná o záměnu thyminu za cytein v exonu 13. V obou případech tyto mutace mají za následek záměnu aminokyseliny a to ve velmi konzervovaných doménách proteinu. Homozygoti pro obě mutace opět umírají v časných stádiích embryonálního vývoje (Daxinger, Harten et al. 2013).

5.3 Modely pro proteinové komplexy s katalytickou podjednotkou Smarca5

Mimo modelů zaměřených přímo na protein Smarca5 existují také modely, které zkoumají funkce komplexů, jejichž katalytickou podjednotku tvoří ATPáza Smarca5. Hlavní výhodou těchto modelů je jejich větší specifita. Jak již bylo popsáno, protein Smarca5 se vyskytuje v mnoha komplexech hrajících nejrůznější role a je v různé míře exprimován ve všech tkáních organismu. Pokud nějakým způsobem zamezíme vzniku funkčního proteinu Smarca5, žádný z těchto komplexů nemůže nadále vykonávat svojí funkci. Modely, které jsou zaměřené na mutace jiných podjednotek, než je Smarca5 v těchto komplexech, nám umožní zkoumat funkce jednoho konkrétního komplexu a to díky tomu, že činnost ostatních komplexů zůstává zachována.

Jedním z modelů pro komplexy, jejichž podjednotku tvoří Smarca5, je myší model s mutací v proteinu Acf1, jež je také označován jako Baz1a (Bromodomain adjacent to zinc finger domain1A). Protein Baz1a se nachází v komplexech ACF a CHRAC, jak bylo popsáno výše. U tohoto modelu, byl pomocí Cre-Lox rekombinace vydeletován exon 6 v genu pro

protein Baz1a a tato delece vede k posunu čtecího rámce. Myši s genotypem *Baz1a* $-/-$, které nesou na obou alelách genu pro protein Baz1a deleci, jsou životaschopné. Vysoká koncentrace proteinu Baz1a byla naměřena zejména ve varlatech, což vedlo k předpokladu, že protein Baz1a může hrát roli při spermatogenezi. Samice s genotypem *Baz1a* $-/-$ byly plodné, ačkoli měly o něco menší počet oocytů ve třech měsících věku oproti divokému typu. Samci s genotypem *Baz1a* $-/-$ však plodní nebyli a byly u nich pozorovány různé abnormality ve tvaru spermií, které nebyly schopné se normálně pohybovat. Hlavičky spermií například postrádaly háček typický pro myší spermie. U samců s genotypem *Baz1a* $-/-$ by pozorován snížený počet spermií a to až pětkrát oproti samcům divokého typu. Myši samci s genotypem *Baz1a* $-/-$ vykazovali velmi rozsáhlé problémy s regulací genové exprese během spermatogeneze. Ačkoli nebyly pozorovány výrazné změny ve struktuře chromatinu oproti kontrolním myším. Tyto problémy s regulací ovlivňovaly velké množství genů a začínaly už během meiotické profáze a během diferenciaci po proběhnutí meiózy se dále zhoršovaly. Ukázalo se tedy, že komplexy ACF a CHRAC, které obsahují proteiny Smarca5 a Baz1a, během spermatogeneze pravděpodobně hrají roli při regulaci transkripce. Nízké hladiny proteinu Baz1a byly pozorovány také u sterilních mužů, tento protein tedy pravděpodobně zastává podobné funkce i u lidí (Dowdle, Mehta et al. 2013).

Závěr, že protein Smarca5 může hrát roli při spermatogenezi, podpořila i další studie. Zde bylo zjištěno, že protein Cerc2 pravděpodobně tvoří ve varlatech komplex s proteinem Smarca5 a byl vytvořen klasický deleční myší model pro protein Cerc2. U samců s genotypem *Cerc2* $-/-$, tedy s delecí na obou alelách genu pro protein Cerc2, byla pozorována snížená fertilita. Ačkoli nebyl ovlivněn tvar ani množství spermií těchto samců, měli signifikantně menší počet mláďat po páření se samicemi divokého typu oproti kontrole. Protein Cerc2 je exprimován hlavně ve spermatogoniích, kde může hrát roli v regulaci transkripce. Formace komplexu proteinů Cerc2 a Smarca5 byla pozorována také u embryonálních buněk (Thompson, Norton et al. 2012).

Dalším komplexem, pro který byl vytvořen myší model, je komplex WICH. Mechanismem homologní rekombinace došlo k delecí genu pro protein WSTF, který je podjednotkou komplexu WICH, kde se nachází spolu s proteinem Smarca5. Protein WSTF se nachází také v komplexu WINAC, a to spolu s proteinem Brm1, což je faktor remodelující chromatin a patří do rodiny SWI/SNF. Myši s genotypem *Wstf* $-/-$, tedy s delecí na obou alelách genu pro *Wstf*, se rodily podle Mendelovského štěpného poměru, ale vykazovaly mortalitu již po pár dnech. Také vykazovaly výrazně menší velikost těla proti divokému typu. Heterozygoti *Wstf* $+/-$ nevykazovali výrazné změny ve fenotypu oproti divokému typu a

přežívali. Byla u nich naměřena zvýšená hladina vápníku, což naznačuje, že hyperkalcémie u pacientů s Williamsovým syndromem může být způsobena delecí jedné z alel genu pro protein WSTF. U myši s genotypem *Wstf* ^{-/-} a také přibližně u 10% myši s genotypem *Wstf* ^{+/-} byly pozorovány závažné srdeční defekty, zejména různé abnormality ve tvaru komor. Častá kardiovaskulární onemocnění spojená s Williamsovým syndromem mohou být přisouzena delecí jedné alely genu pro protein WSTF. K problémům při vývoji srdce může docházet vlivem nepřítomnosti komplexu WINAC, který hraje roli při regulaci transkripce. U myších embryonálních fibroblastů (MEF) s genotypem *Wstf* ^{-/-} byly pozorovány problémy s opravou zlomů na DNA. Tyto problémy mohou pravděpodobně souviset s nepřítomností komplexu WICH, který, jak bylo popsáno, hraje roli při opravě zlomů na DNA (Yoshimura, Kitagawa et al. 2009).

6 Závěr

Remodelace chromatinu je jedním z nástrojů genové exprese a jedná se o relativně složitý proces, kterého se účastní celá řada molekul. Jak bylo popsáno, strukturu chromatinu lze měnit pomocí kovalentních modifikací histonových N-konců, jako je například acetylace, methylace nebo fosforylace. Dalším mechanismem remodelace chromatinu pak může být vytváření nových nukleozómů, remodelace či odstranění těch stávajících, nebo jejich posun po vláknech DNA. Tento typ nekovalentních modifikací chromatinu zajišťují komplexy remodelující chromatin závislé na ATP. Jedním z proteinů, které hrají roli při remodelaci chromatinu je protein Smarca5, který se nachází v několika komplexech. Některé z nich mají schopnost chromatinovou strukturu rozvolňovat a umožnit tak přístup DNA vazebným faktorům, jiné naopak pomáhají vytvářet vysoce kondenzované struktury heterochromatinu. Mutace v genech pro faktory remodelující chromatin mohou vést k deregulaci transkripce a diferenciaci. Takto způsobené poruchy mohou v určitých případech vést až k nádorové transformaci buněk, jak bylo popsáno výše. Pro studium faktorů remodelujících chromatin byly vytvořeny různé modely, které nám mohou pomoci v pochopení významu těchto faktorů pro procesy probíhající v buňkách. V předchozích kapitolách byly popsány myší modely pro proteiny Smarca1 a zejména Smarca5.

Prvním z modelů pro protein Smarca5 je klasický deleční myší mutantní model (knock-out), který byl vytvořen v naší laboratoři. Tento model přinesl informaci o důležitosti proteinu Smarca5 pro embryonální vývoj myšího organismu. Zárodky myších jedinců, kteří nesli delecii v genu *Smarca5*, umírali ve stádiu blastocysty pátý den po oplození. Vzhledem k letálnímu genotypu bylo nutné pro další studium tohoto chromatin remodelačního faktoru vytvořit jeho kondičiální knock-out, tedy tkáňově specificky řízený model delece genu. V současnosti je tento model využíván pro studium diferenciaci lymfoidní a erythroidní krevní řady. V předchozích experimentech naší laboratoře bylo zjištěno, že CD34 pozitivní progenitory pacientů s AML obsahují vysoké hladiny proteinu Smarca5 oproti pacientům, kteří dosáhli kompletní hematologické remise. U zdravých jedinců se hladiny proteinu Smarca5 během diferenciaci buněk hematopoézy snižují. Z popsaných pozorování je v naší laboratoři plánována příprava transgenní myši, jež ponese kondicionálně aktivovatelnou alelu genu pro protein Smarca5. Konstrukt, který bude pro přípravu transgenu vytvořen ponese pouze kódující sekvenci (anglicky coding sequence) mRNA proteinu Smarca5 a díky tomu nebude exprese proteinu regulována interními posttranskripčními buněčnými mechanismy, které rozeznávají především nepřekládané konce molekuly mRNA. Model je navržen tak, aby

byla aktivována transkripce mRNA pro protein Smarca5 v myeloidních kmenových buňkách. Tyto buňky pak by měly vykazovat zvýšenou hladinu proteinu Smarca5 v celém průběhu diferenciace, což odpovídá jevu pozorovanému u AML. Studium vytvořené transgenní myši pomůže lépe pochopit vliv hladiny exprese Smarca5 na vývoj AML, nádorových onemocnění obecně a ontogenezi myšího organismu. Také pomůže zodpovědět otázku, zda zvýšená hladina proteinu Smarca5 během diferenciace myeloidních buněk může vést k nádorové transformaci. V současnosti pracuji na klonování ‚targetovacího‘ konstruktů a přípravy transgenních kolonií embryonálních kmenových buněk nutných pro následující tvorbu transgenního modelu. Studium tohoto transgenního modelu bude z části předmětem mého magisterského studia.

Další myší model pomohl odhalit možnou roli komplexu ACF, který se skládá z proteinů Smarca5 a Acf1, během spermatogeneze. Samci s klasickou delecí s genu pro protein Acf1 jsou sterilní, vykazují menší počet spermií a různé abnormality v jejich tvaru. Při studiu dalšího modelu s delecí genu pro protein Cerc2, bylo zjištěno, že i tento protein a komplex, který vytváří s proteinem Smarca5, má pravděpodobně vliv na spermatogenezi, protože samci s delecí na obou alelách genu pro protein Cerc2 mají sníženou fertilitu oproti kontrolním myším. Myší model s delecí genu pro protein WSTF, který s proteinem Smarca5 tvoří komplex WICH, pomohl při objasnění některých projevů Williamsova syndromu, jako je hyperkalcémie a srdeční poruchy, které jsou pravděpodobně spojené s delecí jedné alely genu pro WSTF.

Jak bylo popsáno, myší modely jsou velmi dobrým nástrojem vedoucím k lepšímu poznání funkcí jednotlivých proteinů v buněčných procesech. Studium modelů pro protein Smarca5 může pomoci odhalit další souvislosti mezi tímto proteinem a regulací transkripce či diferenciace buněk. Popsaný model, který právě v laboratoři připravujeme, může pomoci nalézt roli, jakou Smarca5 hraje u nádorové transformace například u AML a dovést nás k lepšímu pochopení tohoto onemocnění. Myslím, že tedy lze říct, že vývoj myších modelů pro studium funkcí proteinů, jako jsou faktory remodelující chromatin a mezi nimi i protein Smarca5, má nepopíratelně svůj velký význam.

7 Seznam použité literatury

- Bakshi, R., T. Prakash, D. Dash and V. Brahmachari (2004). "In silico characterization of the INO80 subfamily of SWI2/SNF2 chromatin remodeling proteins." Biochem Biophys Res Commun **320**(1): 197-204.
- Becker, P. B. (2002). "Nucleosome sliding: facts and fiction." EMBO J **21**(18): 4749-4753.
- Berger, S. L. (2002). "Histone modifications in transcriptional regulation." Curr Opin Genet Dev **12**(2): 142-148.
- Bozhenok, L., P. A. Wade and P. Varga-Weisz (2002). "WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci." EMBO J **21**(9): 2231-2241.
- Bultman, S., T. Gebuhr, D. Yee, C. La Mantia, J. Nicholson, A. Gilliam, F. Randazzo, D. Metzger, P. Chambon, G. Crabtree and T. Magnuson (2000). "A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes." Mol Cell **6**(6): 1287-1295.
- Cavellan, E., P. Asp, P. Percipalle and A. K. Farrants (2006). "The WSTF-SNF2h chromatin remodeling complex interacts with several nuclear proteins in transcription." J Biol Chem **281**(24): 16264-16271.
- Collins, N., R. A. Poot, I. Kukimoto, C. Garcia-Jimenez, G. Dellaire and P. D. Varga-Weisz (2002). "An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin." Nat Genet **32**(4): 627-632.
- Corona, D. F., A. Eberharter, A. Budde, R. Deuring, S. Ferrari, P. Varga-Weisz, M. Wilm, J. Tamkun and P. B. Becker (2000). "Two histone fold proteins, CHRAC-14 and CHRAC-16, are developmentally regulated subunits of chromatin accessibility complex (CHRAC)." EMBO J **19**(12): 3049-3059.
- Daxinger, L., S. K. Harten, H. Oey, T. Epp, L. Isbel, E. Huang, N. Whitelaw, A. Apedaile, A. Sorolla, J. Yong, V. Bharti, J. Sutton, A. Ashe, Z. Pang, N. Wallace, D. J. Gerhardt, M. E. Blewitt, J. A. Jeddloh and E. Whitelaw (2013). "An ENU mutagenesis screen identifies novel and known genes involved in epigenetic processes in the mouse." Genome Biol **14**(9): R96.
- Dowdle, J. A., M. Mehta, E. M. Kass, B. Q. Vuong, A. Inagaki, D. Egli, M. Jasin and S. Keeney (2013). "Mouse BAZ1A (ACF1) is dispensable for double-strand break repair but is essential for averting improper gene expression during spermatogenesis." PLoS Genet **9**(11): e1003945.
- Eberharter, A., I. Vetter, R. Ferreira and P. B. Becker (2004). "ACF1 improves the effectiveness of nucleosome mobilization by ISWI through PHD-histone contacts." EMBO J **23**(20): 4029-4039.
- Fairman-Williams, M. E., U. P. Guenther and E. Jankowsky (2010). "SF1 and SF2 helicases: family matters." Curr Opin Struct Biol **20**(3): 313-324.
- Fyodorov, D. V., M. D. Blower, G. H. Karpen and J. T. Kadonaga (2004). "Acf1 confers unique activities to ACF/CHRAC and promotes the formation rather than disruption of chromatin in vivo." Genes Dev **18**(2): 170-183.
- Fyodorov, D. V. and J. T. Kadonaga (2002). "Binding of Acf1 to DNA involves a WAC motif and is important for ACF-mediated chromatin assembly." Mol Cell Biol **22**(18): 6344-6353.
- Guetg, C., P. Lienemann, V. Sirri, I. Grummt, D. Hernandez-Verdun, M. O. Hottiger, M. Fussenegger and R. Santoro (2010). "The NoRC complex mediates the heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats." EMBO J **29**(13): 2135-2146.

- Hanai, K., H. Furuhashi, T. Yamamoto, K. Akasaka and S. Hirose (2008). "RSF governs silent chromatin formation via histone H2Av replacement." PLoS Genet **4**(2): e1000011.
- Hans, F. and S. Dimitrov (2001). "Histone H3 phosphorylation and cell division." Oncogene **20**(24): 3021-3027.
- Hartlepp, K. F., C. Fernandez-Tornero, A. Eberharter, T. Grune, C. W. Muller and P. B. Becker (2005). "The histone fold subunits of Drosophila CHRAC facilitate nucleosome sliding through dynamic DNA interactions." Mol Cell Biol **25**(22): 9886-9896.
- He, X., H. Y. Fan, G. J. Narlikar and R. E. Kingston (2006). "Human ACF1 alters the remodeling strategy of SNF2h." J Biol Chem **281**(39): 28636-28647.
- Chang, E. Y., H. Ferreira, J. Somers, D. A. Nusinow, T. Owen-Hughes and G. J. Narlikar (2008). "MacroH2A allows ATP-dependent chromatin remodeling by SWI/SNF and ACF complexes but specifically reduces recruitment of SWI/SNF." Biochemistry **47**(51): 13726-13732.
- Cheung, P., C. D. Allis and P. Sassone-Corsi (2000). "Signaling to chromatin through histone modifications." Cell **103**(2): 263-271.
- Chong, S., N. Vickaryous, A. Ashe, N. Zamudio, N. Youngson, S. Hemley, T. Stopka, A. Skoultschi, J. Matthews, H. S. Scott, D. de Kretser, M. O'Bryan, M. Blewitt and E. Whitelaw (2007). "Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse." Nat Genet **39**(5): 614-622.
- Ito, T., M. E. Levenstein, D. V. Fyodorov, A. K. Kutach, R. Kobayashi and J. T. Kadonaga (1999). "ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly." Genes Dev **13**(12): 1529-1539.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Krishnan, N., D. G. Jeong, S. K. Jung, S. E. Ryu, A. Xiao, C. D. Allis, S. J. Kim and N. K. Tonks (2009). "Dephosphorylation of the C-terminal tyrosyl residue of the DNA damage-related histone H2A.X is mediated by the protein phosphatase eyes absent." J Biol Chem **284**(24): 16066-16070.
- Kukimoto, I., S. Elderkin, M. Grimaldi, T. Oelgeschlager and P. D. Varga-Weisz (2004). "The histone-fold protein complex CHRAC-15/17 enhances nucleosome sliding and assembly mediated by ACF." Mol Cell **13**(2): 265-277.
- Lan, L., A. Ui, S. Nakajima, K. Hatakeyama, M. Hoshi, R. Watanabe, S. M. Janicki, H. Ogiwara, T. Kohno, S. Kanno and A. Yasui (2010). "The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells." Mol Cell **40**(6): 976-987.
- LeRoy, G., G. Orphanides, W. S. Lane and D. Reinberg (1998). "Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates in vitro." Science **282**(5395): 1900-1904.
- Li, J., G. Langst and I. Grummt (2006). "NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes." EMBO J **25**(24): 5735-5741.
- Loyola, A., J. Y. Huang, G. LeRoy, S. Hu, Y. H. Wang, R. J. Donnelly, W. S. Lane, S. C. Lee and D. Reinberg (2003). "Functional analysis of the subunits of the chromatin assembly factor RSF." Mol Cell Biol **23**(19): 6759-6768.
- Loyola, A., G. LeRoy, Y. H. Wang and D. Reinberg (2001). "Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription." Genes Dev **15**(21): 2837-2851.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." Nature **389**(6648): 251-260.
- Manelyte, L. and G. Längst (2013). Chromatin Remodelers and Their Way of Action.

- Marfella, C. G. and A. N. Imbalzano (2007). "The Chd family of chromatin remodelers." Mutat Res **618**(1-2): 30-40.
- Martens, M. (2013). "Developmental and cognitive troubles in Williams syndrome." Handb Clin Neurol **111**: 291-293.
- Percipalle, P., N. Fomproix, E. Cavellan, R. Voit, G. Reimer, T. Kruger, J. Thyberg, U. Scheer, I. Grummt and A. K. Farrants (2006). "The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription." EMBO Rep **7**(5): 525-530.
- Perpelescu, M., N. Nozaki, C. Obuse, H. Yang and K. Yoda (2009). "Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex." J Cell Biol **185**(3): 397-407.
- Poot, R. A., L. Bozhenok, D. L. van den Berg, S. Steffensen, F. Ferreira, M. Grimaldi, N. Gilbert, J. Ferreira and P. D. Varga-Weisz (2004). "The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci." Nat Cell Biol **6**(12): 1236-1244.
- Poot, R. A., G. Dellaire, B. B. Hulsmann, M. A. Grimaldi, D. F. Corona, P. B. Becker, W. A. Bickmore and P. D. Varga-Weisz (2000). "HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodelling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins." EMBO J **19**(13): 3377-3387.
- Richmond, T. J. and C. A. Davey (2003). "The structure of DNA in the nucleosome core." Nature **423**(6936): 145-150.
- Sanchez-Molina, S., O. Mortusewicz, B. Bieber, S. Auer, M. Eckey, H. Leonhardt, A. A. Friedl and P. B. Becker (2011). "Role for hACF1 in the G2/M damage checkpoint." Nucleic Acids Res **39**(19): 8445-8456.
- Santoro, R., J. Li and I. Grummt (2002). "The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription." Nat Genet **32**(3): 393-396.
- Sheu, J. J., B. Guan, J. H. Choi, A. Lin, C. H. Lee, Y. T. Hsiao, T. L. Wang, F. J. Tsai and M. Shih Ie (2010). "Rsf-1, a chromatin remodeling protein, induces DNA damage and promotes genomic instability." J Biol Chem **285**(49): 38260-38269.
- Sheu, J. J., J. H. Choi, I. Yildiz, F. J. Tsai, Y. Shaul, T. L. Wang and M. Shih Ie (2008). "The roles of human sucrose nonfermenting protein 2 homologue in the tumor-promoting functions of Rsf-1." Cancer Res **68**(11): 4050-4057.
- Shih Ie, M., J. J. Sheu, A. Santillan, K. Nakayama, M. J. Yen, R. E. Bristow, R. Vang, G. Parmigiani, R. J. Kurman, C. G. Trope, B. Davidson and T. L. Wang (2005). "Amplification of a chromatin remodeling gene, Rsf-1/HBXAP, in ovarian carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 14004-14009.
- Shogren-Knaak, M., H. Ishii, J. M. Sun, M. J. Pazin, J. R. Davie and C. L. Peterson (2006). "Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions." Science **311**(5762): 844-847.
- Stopka, T. and A. I. Skoultschi (2003). "The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14097-14102.
- Stopka, T., D. Zakova, O. Fuchs, O. Kubrova, J. Blafkova, J. Jelinek, E. Necas and J. Zivny (2000). "Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia." Leukemia **14**(7): 1247-1252.
- Strohner, R., A. Nemeth, P. Jansa, U. Hofmann-Rohrer, R. Santoro, G. Langst and I. Grummt (2001). "NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines." EMBO J **20**(17): 4892-4900.
- Strohner, R., M. Wachsmuth, K. Dachauer, J. Mazurkiewicz, J. Hochstatter, K. Rippe and G. Langst (2005). "A 'loop recapture' mechanism for ACF-dependent nucleosome remodeling." Nat Struct Mol Biol **12**(8): 683-690.

- Thompson, P. J., K. A. Norton, F. H. Niri, C. E. Dawe and H. E. McDermid (2012). "CECR2 is involved in spermatogenesis and forms a complex with SNF2H in the testis." J Mol Biol **415**(5): 793-806.
- Torres-Padilla, M. E. and M. Zernicka-Goetz (2006). "Role of TIF1alpha as a modulator of embryonic transcription in the mouse zygote." J Cell Biol **174**(3): 329-338.
- Varga-Weisz, P. D., M. Wilm, E. Bonte, K. Dumas, M. Mann and P. B. Becker (1997). "Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II." Nature **388**(6642): 598-602.
- Vargova, J., K. Vargova, A. I. Skoultchi and T. Stopka (2009). "Nuclear localization of ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) in mouse." Front Biosci (Elite Ed) **1**: 553-559.
- Versteeg, I., N. Sevenet, J. Lange, M. F. Rousseau-Merck, P. Ambros, R. Handgretinger, A. Aurias and O. Delattre (1998). "Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer." Nature **394**(6689): 203-206.
- Wong, A. K., F. Shanahan, Y. Chen, L. Lian, P. Ha, K. Hendricks, S. Ghaffari, D. Iliev, B. Penn, A. M. Woodland, R. Smith, G. Salada, A. Carillo, K. Laity, J. Gupte, B. Swedlund, S. V. Tavtigian, D. H. Teng and E. Lees (2000). "BRG1, a component of the SWI-SNF complex, is mutated in multiple human tumor cell lines." Cancer Res **60**(21): 6171-6177.
- Wu, C., A. Bassett and A. Travers (2007). "A variable topology for the 30-nm chromatin fibre." EMBO Rep **8**(12): 1129-1134.
- Xiao, A., H. Li, D. Shechter, S. H. Ahn, L. A. Fabrizio, H. Erdjument-Bromage, S. Ishibe-Murakami, B. Wang, P. Tempst, K. Hofmann, D. J. Patel, S. J. Elledge and C. D. Allis (2009). "WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity." Nature **457**(7225): 57-62.
- Yamamichi, N., K. Inada, M. Ichinose, M. Yamamichi-Nishina, T. Mizutani, H. Watanabe, K. Shiogama, M. Fujishiro, T. Okazaki, N. Yahagi, T. Haraguchi, S. Fujita, Y. Tsutsumi, M. Omata and H. Iba (2007). "Frequent loss of Brm expression in gastric cancer correlates with histologic features and differentiation state." Cancer Res **67**(22): 10727-10735.
- Yang, J. G., T. S. Madrid, E. Sevastopoulos and G. J. Narlikar (2006). "The chromatin-remodeling enzyme ACF is an ATP-dependent DNA length sensor that regulates nucleosome spacing." Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1078-1083.
- Yip, D. J., C. P. Corcoran, M. Alvarez-Saavedra, A. DeMaria, S. Rennick, A. J. Mears, M. A. Rudnicki, C. Messier and D. J. Picketts (2012). "Snf2l regulates Foxg1-dependent progenitor cell expansion in the developing brain." Dev Cell **22**(4): 871-878.
- Yoshimura, K., H. Kitagawa, R. Fujiki, M. Tanabe, S. Takezawa, I. Takada, I. Yamaoka, M. Yonezawa, T. Kondo, Y. Furutani, H. Yagi, S. Yoshinaga, T. Masuda, T. Fukuda, Y. Yamamoto, K. Ebihara, D. Y. Li, R. Matsuoka, J. K. Takeuchi, T. Matsumoto and S. Kato (2009). "Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF)." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(23): 9280-9285.
- Zentner, G. E. and S. Henikoff (2013). "Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications." Nat Struct Mol Biol **20**(3): 259-266.
- Zhou, Y. and I. Grummt (2005). "The PHD finger/bromodomain of NoRC interacts with acetylated histone H4K16 and is sufficient for rDNA silencing." Curr Biol **15**(15): 1434-1438.
- Zhou, Y., R. Santoro and I. Grummt (2002). "The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription." EMBO J **21**(17): 4632-4640.